

- [12] CHEN H, XIAO Y Q, LI L. Studies on chemical constituents in fruit of *Gardenia jasminoides* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32(11): 1041-1043.
- [13] PFISTER S, MEYER P, STECK A, et al. Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* Linne) [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(9): 2612-2615.
- [14] VAN CALSTEREN M R, BISSONNETTE M C, CORMIER F, et al. Spectroscopic characterization of crocetin derivatives from *Crocus sativus* and *Gardenia jasminoides* [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(4): 1055-1061.
- [15] ZHANG Y, XIA Y, CHEN Y, et al. Preparation of pure gardenia yellow pigment [J]. Food Ferm Ind (食品与发酵工业), 2009, 35(2): 100-103.
- [16] LIU S J, ZHANG X T, WANG W M, et al. Studies on chemical constituents of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(2): 238-241.
- [17] GU Q K, ZHOU X Q, BI Z M, et al. Chemical constituents of the fruits of *Gardenia jasminoides* from *Grandiflora* (Lour) *makino* [J]. Chem Ind Forest Prod(林产化学与工业), 2009, 29(6): 61-64.

收稿日期: 2013-04-27

## 白花蛇舌草栽培品与野生品有效成分含量测定

林海, 龚又明, 邓广海\*, 容穗华(广东省中医院药学部, 广州 510120)

**摘要:** 目的 测定白花蛇舌草野生品和栽培品有效成分的含量, 为白花蛇舌草的质量标准和规范化栽培提供依据。方法 采用 HPLC 测定白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸的含量, 采用紫外分光光度法测定总黄酮的含量。结果 不同产地白花蛇舌草野生品中 3 种成分含量差异较大, 其中齐墩果酸含量为  $0.328\ 1\sim 1.191\ 7\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 熊果酸含量为  $1.686\ 5\sim 2.641\ 0\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 总黄酮含量为  $0.921\ 9\%\sim 1.611\ 7\%$ ; 广东、广西栽培品中 3 种成分含量均较高, 且不同批次栽培品中各成分含量没有显著差异, 具有一定的稳定性。结论 白花蛇舌草由野生转化为家种, 有利于保证药材的有效性和稳定性。

**关键词:** 白花蛇舌草; 齐墩果酸; 熊果酸; 总黄酮; 野生品; 栽培品; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)12-1319-04

### Determination of the Content of Effective Component of Wild and Cultivated Products of *Hedyotis Diffusa*

LIN Hai, GONG Youming, DENG Guanghai\*, RONG Suihua(Pharmaceutical Department, Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510120, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine the content of the active component of wild and cultivated products of *Hedyotis diffusa*, provide a basis for its quality standards and standardized cultivation. **METHODS** The content of oleanolic acid and ursolic acid in *Hedyotis diffusa* was determined by HPLC, and the content of total flavonoids was determined by UV. **RESULTS** The content of three kinds of active component were significantly different in different areas of wild products, and the content of oleanolic acid was  $0.328\ 1\sim 1.191\ 7\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ; the content of ursolic acid was  $1.686\ 5\sim 2.641\ 0\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ; the content of total flavonoids was  $0.921\ 9\%\sim 1.611\ 7\%$ . The content in the three kinds of Guangdong and Guangxi cultivated products were higher, there was no significantly difference between them, and kept certain stability. **CONCLUSION** Application of the home-grown product instead of wild products of *Hedyotis diffusa*, can ensure the effectiveness and stability of the quality.

**KEY WORDS:** *Hedyotis diffusa*; oleanolic acid; ursolic acid; total flavonoids; wild products; cultivated products; HPLC

白花蛇舌草又名蛇舌草、蛇利草、蛇总管、二叶葎等, 为茜草科植物白花蛇舌草 [*Hedyotis diffusa* (Willd.) Roxb.] 的干燥全草<sup>[1]</sup>, 主产于福建、广东、广西、云南、浙江等地, 常生于潮湿的田边、沟边、路旁和草地<sup>[2]</sup>。传统医学认为其具有清热解毒、活血化瘀、利水渗湿、消肿止痛等作用,

为临床常用抗肿瘤药<sup>[3]</sup>。现代药理研究表明, 白花蛇舌草具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗化学诱变、抗炎抗菌、保肝利胆、镇痛解毒等作用<sup>[4]</sup>。齐墩果酸和熊果酸是其主要有效成分, 前者有较强的抗菌消炎作用, 同时还具有保护肝脏、利水渗湿等功效; 后者对多种恶性肿瘤细胞生长有抑

基金项目: 广东省中医药局资助项目(20122135)

作者简介: 林海, 男, 主管药师 Tel: (020)81887233  
(020)81887233-31202 E-mail: handsomehai@126.com

E-mail: 13688879998@163.com

\*通信作者: 邓广海, 男, 硕士, 中药师 Tel:

制作用,对诱癌致癌物也有一定的抵抗作用<sup>[5]</sup>,而总黄酮具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、增强免疫力等作用<sup>[6]</sup>。白花蛇舌草临床用量大,野生资源日益减少,价格不断上升,具有良好的发展人工种植前景,近年来白花蛇舌草的栽培规模也越来越大。但是,栽培品是否能代替野生品来确保其用药的有效性,目前该类的文献报道较少。本实验测定白花蛇舌草不同来源野生品和栽培品中齐墩果酸、熊果酸和总黄酮的含量,为其质量标准的建立和规范化的栽培提供一定依据,同时也为其临床用药的有效性提供一定的依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括 DAD 检测器、自动进样器、在线脱气、四元泵(美国 Agilent 公司); BS210S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); KQ-300VDB 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

齐墩果酸对照品(批号: 0709-9803)、熊果酸对照品(批号: 110742-200516), 芦丁对照品(批号: 10080-200306)均购于中国药品生物制品检定所,纯度均≥98.0%; 白花蛇舌草采集于广东、广西、福建等地,经广州中医院药学部冯倩茹副主任中药师鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 [*Hedyotis diffusa* (Willd.) Roxb.] 的干燥全草; 乙腈为色谱纯(美国 Burdick & Jackson 公司); 其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 齐墩果酸和熊果酸含量测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-20 mmol(pH=7.84) 磷酸钾缓冲液(45:55); 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 °C; 检测波长: 210 nm。进样量为 10 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 分别取齐墩果酸和熊果酸对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含齐墩果酸 0.44 mg 和每 1 mL 含熊果酸 0.82 mg 的溶液,摇匀,即得。

**2.1.3 供试品溶液制备** 取白花蛇舌草粉末 0.5 g,精密称定,加入 20 mL 甲醇,超声提取 30 min,放冷至室温,滤过,滤渣加 20 mL 甲醇继续提取 15 min,滤过,合并 2 次滤液,浓缩,置于 5 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液即得。

**2.1.4 标准曲线的制备** 精密量取齐墩果酸和熊果酸对照品混合溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按“2.1.1”项下色谱条件测定,记录峰面积。以峰面积  $Y$  为纵坐标,浓度  $X$  为横坐标绘制标准曲线,得齐墩果酸回归方程为:  $Y = 2.4861X - 8.7915$  ( $r = 0.9996$ ), 线性范围为 221~352 μg·mL<sup>-1</sup>; 熊果酸回归方程为  $Y = 1.6024X + 3.5412$  ( $r = 0.9998$ ), 线性范围为 41~656 μg·mL<sup>-1</sup>。

**2.1.5 仪器精密度试验** 精密吸取齐墩果酸和熊果酸对照品溶液 10 μL,按“2.1.1”项下色谱条件重复进样 5 次,测定峰面积积分值,结果齐墩果酸和熊果酸的峰面积的 RSD( $n=5$ )分别为 0.48%, 0.39%。

**2.1.6 稳定性试验** 分别取白花蛇舌草同一份供试品溶液,按“2.1.3”项下方法提取,按“2.1.1”项下色谱条件,在 0, 4, 8, 16, 24 h 进样 10 μL 测定,结果齐墩果酸和熊果酸的 RSD( $n=5$ )分别为 2.47%, 1.78%。

**2.1.7 重复性试验** 取同一批白花蛇舌草样品 5 份,按“2.1.3”项下方法提取,按“2.1.1”项下色谱条件分别进样 10 μL,由标准曲线求出其含量,结果齐墩果酸和熊果酸峰面积的 RSD( $n=5$ )分别为 2.14%, 1.82%。

**2.1.8 加样回收率试验** 取白花蛇舌草粉末 0.5 g,精密称定,按上述含量测定方法进行含量测定,测定 2 种对照品的含量。另外取同批药材粉末 0.25 g,精密称定,加入齐墩果酸和熊果酸适量,测定其含量。结果齐墩果酸和熊果酸的平均回收率为(98.71±0.17)%, (98.82±1.04)%; RSD( $n=5$ )分别为 2.44%, 2.15%, 结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 Results of recovery

成分	已知量/ mg	加入量/ mg	测定量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
齐墩果酸	0.224 0	0.24	0.460 2	98.41	98.71	2.44
	0.224 5	0.24	0.461 4	98.69		
	0.224 7	0.24	0.462 1	98.91		
	0.226 4	0.24	0.462 9	98.53		
	0.223 6	0.24	0.431 2	99.01		
熊果酸	0.633 4	0.62	1.2442	98.52	98.82	2.15
	0.634 9	0.62	1.2457	98.52		
	0.635 4	0.62	1.2512	99.32		
	0.640 2	0.62	1.2498	98.32		
	0.632 1	0.62	1.2485	99.42		

**2.1.9 含量测定** 按“2.1”项下含量测定方法，测定白花蛇舌草野生品和栽培品中齐墩果酸和熊果酸的含量。结果见表 2 和图 1。

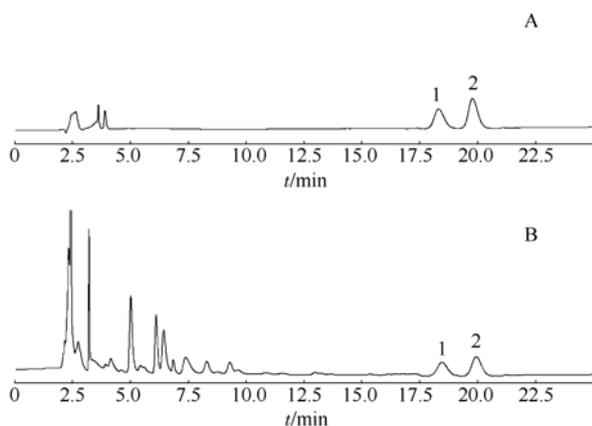


图 1 白花蛇舌草高效液相色谱图

A-对照品; B-样品; 1-齐墩果酸; 2-熊果酸

Fig 1 HPL chromatography of *Hedyotis diffusa*

A-control; B-sample; 1-oleanolic acid; 2-ursolic acid

## 2.2 总黄酮含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 取芦丁对照品 10.4 mg，

精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 70%乙醇 40 mL 微热使溶解，冷至室温以 70%乙醇稀释至刻度，摇匀，即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取白花蛇舌草粉末(过三号筛)0.1 g，精密称定，置 150 mL 烧瓶中，加 70%乙醇 100 mL，摇匀，回流提取 2.0 h，冷却至室温，滤过，残渣以少量 70%乙醇洗涤，合并滤液，水浴挥去乙醇，加入已处理好的聚酰胺柱(30~60 目，1 g，内径约为 9 mm)，依次用 20 mL 水和 70%乙醇洗脱，收集乙醇洗脱液，水浴蒸干，残渣以 70%乙醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，摇匀，即得。

**2.2.3 线性关系考察** 精密移“2.2.1”项下芦丁对照溶液 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL，置 25 mL 量瓶，各加 70%乙醇至 6.0 mL，加 5%亚硝酸钠溶液 1.0 mL，摇匀，放置 5 min，加入 10%硝酸铝溶液 1.0 mL，摇匀，放置 5 min，加氢氧化钠试液 10.0 mL，加 70%乙醇至刻度，混匀，放置 15 min，以 1 号量瓶溶液为空白，于 507 nm 处测

表 2 白花蛇舌草野生品和栽培品有效成分含量测定结果

Tab 2 Results of content determination in wild and cultivated products of *Hedyotis diffusa*

生长方式	来源	齐墩果酸/mg·g <sup>-1</sup>	熊果酸/mg·g <sup>-1</sup>	总黄酮/%	
野生品	广东汕头	0.882 0±0.029 9	2.471 5±0.089 1	1.046 7±0.032 7	
	广东揭阳	0.901 4±0.031 2	2.641 0±0.092 0	0.982 3±0.031 9	
	广东高要	1.191 7±0.034 0	2.374 3±0.092 8	1.321 5±0.034 7	
	广西南宁	0.646 4±0.021 6	1.686 5±0.071 5	1.041 4±0.020 8	
	广西梧州	0.712 9±0.027 1	1.881 9±0.072 7	1.105 4±0.025 9	
	广西横县	0.631 8±0.029 1	1.901 2±0.085 2	1.067 2±0.026 6	
	福建华安	0.617 8±0.028 4	2.079 2±0.083 9	1.481 3±0.034 5	
	福建安溪	0.603 3±0.020 4	1.925 5±0.074 0	1.611 7±0.036 7	
	浙江临安	0.3281±0.008 9	2.631 9±0.105 2	0.921 9±0.020 8	
	安徽阜阳	0.615 8±0.023 4	2.456 2±0.090 9	1.332 6±0.034 8	
	栽培品	广东河源	0.918 4±0.032 8	2.641 8±0.093 3	1.331 5±0.037 8
		广东河源	0.903 3±0.030 4	2.581 8±0.089 7	1.264 5±0.035 9
广东河源		0.931 5±0.031 1	2.601 2±0.093 5	1.233 0±0.032 6	
广东河源		0.895 6±0.028 7	2.663 4±0.096 8	1.371 5±0.037 1	
广东河源		0.917 7±0.032 0	2.561 7±0.091 8	1.332 7±0.037 9	
广西玉林		0.886 5±0.030 5	2.401 7±0.089 1	1.421 7±0.036 8	
广西玉林		0.878 9±0.031 8	2.432 9±0.091 2	1.403 3±0.035 2	
广西玉林		0.891 7±0.029 5	2.337 9±0.086 8	1.431 8±0.034 4	
广西玉林		0.862 4±0.029 1	2.417 8±0.088 5	1.420 6±0.035 0	
广西玉林		0.851 2±0.028 6	2.326 4±0.086 3	1.440 7±0.037 4	

定吸光度值,以总黄酮量(mg)为纵坐标,以吸光度值为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $A=1.984C-0.004$ , $r=0.9997$ ,芦丁在0.208~1.248 mg内具有良好线性关系。

**2.2.4 仪器精密度试验** 精密称取白花蛇舌草样品0.1 g,按“2.2.2”项下方法提取,然后按照“2.2.3”项下“加5%亚硝酸钠溶液1.0 mL”起,依法处理,测定507 nm处吸光度值,平行操作5份,记录数值,结果其吸光度的RSD为0.42%。

**2.2.5 含量测定** 称取白花蛇舌草样品0.1 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法提取,按“2.2.3”项下“加5%亚硝酸钠溶液1.0 mL”起,依法处理,测定507 nm处吸光度值,按回归方程计算药材中总黄酮含量。结果见表2。

不同产地白花蛇舌草野生品中3种成分含量差异较大,其中齐墩果酸含量为0.328 1~1.191 7 mg·g<sup>-1</sup>,熊果酸含量为1.686 5~2.641 0 mg·g<sup>-1</sup>,总黄酮含量为0.921 9%~1.611 7%;广东和广西10批栽培品中,广东河源栽培品中齐墩果酸含量为0.895 6~0.931 5 mg·g<sup>-1</sup>,熊果酸含量为2.581 8~2.663 4 mg·g<sup>-1</sup>,该2种成分的含量比广西玉林栽培品略高,总黄酮的含量以广西玉林栽培品含量较高在1.403 3%~1.440 7%之间,栽培品中3种成分的含量均在野生品含量测定范围内,且相同产地不同批次栽培品之间3种成分含量差异较小,具有一定的稳定性。

### 3 讨论

白花蛇舌草为清热解毒类的常用中药,在肿瘤治疗上具有独特的疗效,近年来临床用量逐渐增大。白花蛇舌草的化学成分较复杂,主要含有三萜酸、黄酮类、蒽醌类等多种化合物<sup>[7]</sup>,而黄酮类、齐墩果酸和熊果酸被认为是主要的有效成分之一,常被作为质量评价的指标成分<sup>[8]</sup>。本实验对白花蛇舌草野生品和栽培品中以上3种成分进行测定,比较其含量差异。由于熊果酸和齐墩果酸两者性质相似,不易分离,本实验对多种流动相

进行优化,结果以乙腈-20 mmol(pH=7.84)磷酸钾缓冲液作为流动相效果最佳,两者的分离度>1.5,达到基线分离。总黄酮的含量测定采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法也具有一定的灵敏度和精密度。

结果表明,不同产地白花蛇舌草中齐墩果酸、熊果酸和总黄酮等成分含量差异较大,广东、广西产地的栽培品中3种成分含量均较高,且不同批次栽培品中各成分含量没有显著差异,说明其由野生转化为家种,有利于保证药材的有效性和稳定性。如果能够建立规范化的GAP基地,更能保证其药材质量的稳定性,为市场提供安全有效的原药材,保证临床用药的需求。但其栽培品是否能够完成替代野生品,还需要进行药效学和毒理学的研究。

### REFERENCES

- [1] Guangdong Provincial Food and Drug Administration. Guangdong Chinese Materia Medica Standards(广东省中药材标准) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2004: 75-76.
- [2] Nanjing University of Traditional Chinese. Dictionary of Chinese Medicine(中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006: 1039-1041.
- [3] YAO Y H, DONG F Y. The anti-tumor research of *Hedyotis diffusa* [J]. Chin Pharm(中国药房), 2006, 17(16): 1261-1262.
- [4] ZHU B, LU C H. The chemical composition and pharmacological research of *Hedyotis diffusa* [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2011, 23(5):52-55.
- [5] ZHENG M, FAN B, DING H, et al. HPLC determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Hedyotis diffusa* Willd from different sources [J]. Chin Med Clin(中国药物与临床), 2010, 10(3): 261-263.
- [6] HUANG H, TIAN S Y. Study on the ultrasonic extraction technique of the total flavonoids from *Hedyotis diffusa* Willd. [J]. China Mod Med(中国当代医药), 2011,18 (23): 144-146.
- [7] XIE Y, LIN S Y, QI Q L. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Oldenlandia diffusa* (Willd) Roxb. by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2006, 37(8): 55-57.
- [8] ZHANG X M, LIANG X M, SUN G Y, et al. Determination of oleanolic acid and ursolic in *Pterocephalus hookeri* from different batches and different regions by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(12): 1125-1128.

收稿日期: 2013-03-05